

(19) 日本國特許序 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-502723

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月23日

(51) Int. Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	
C 0 7 K 14/79		8318-4H		
A 6 1 K 38/16				
C 1 2 N 5/10				
		8314-4C	A 6 1 K 37/ 14	
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		審査請求	未請求	予備審査請求 有
				(全 15 頁) 最終頁に続く

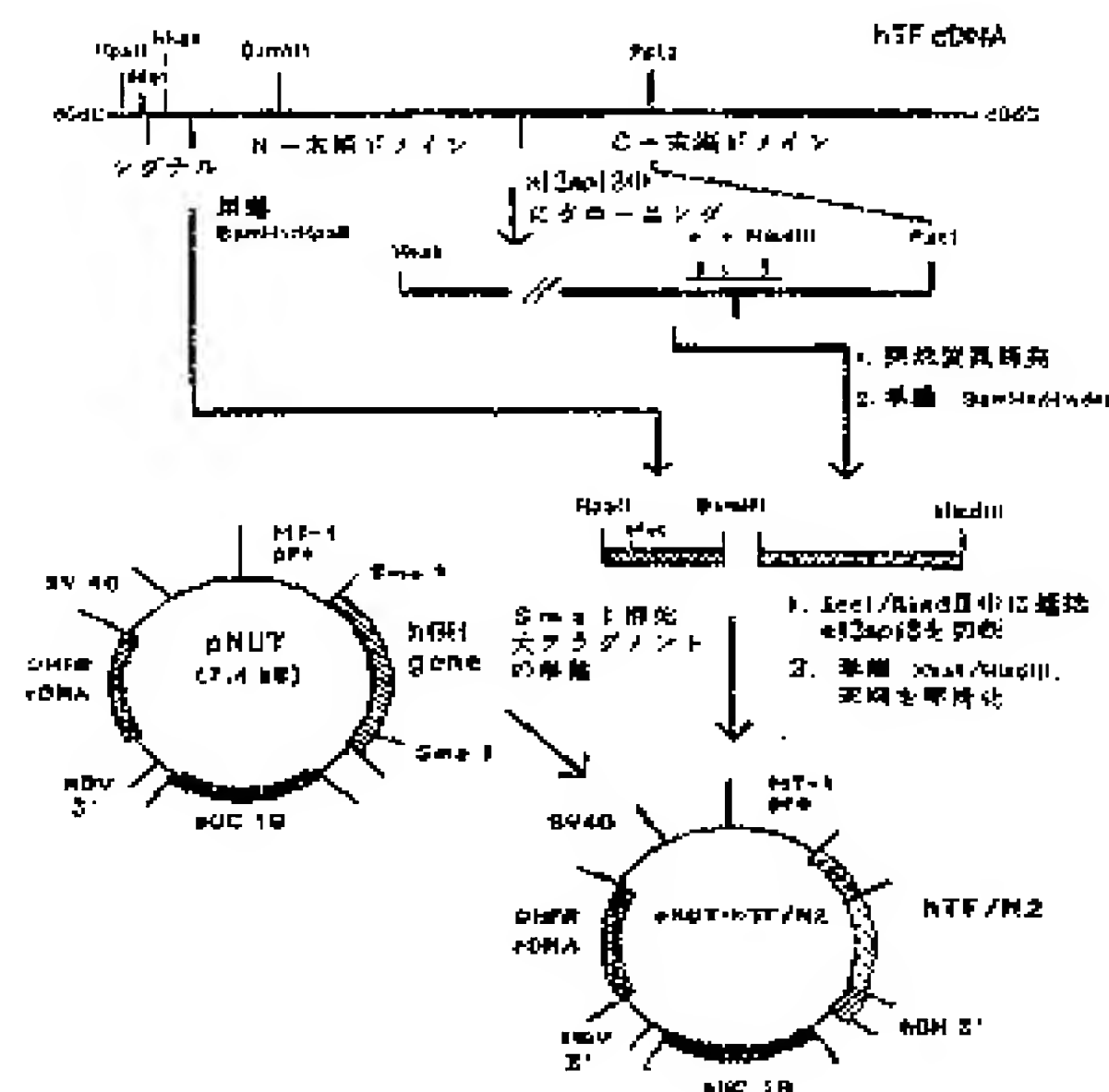
(21)出願番号	特願平4-505865	(71)出願人	ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・ アンド・ステイト・アグリカルチュラル・ カレッジ アメリカ合衆国バーモント州05405バーリ ントン（番地なし）
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月6日	(71)出願人	ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコ ロンビア カナダ国ブリティッシュ・コロンビア・ブ リテイッシュ・コロンビア・バンクーバー （番地なし）
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)8月6日	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉
(86)国際出願番号	PCT/US92/00928		
(87)国際公開番号	WO92/13550		
(87)国際公開日	平成4年(1992)8月20日		
(31)優先権主張番号	652, 869		
(32)優先日	1991年2月8日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), CA, JP		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

(57) 【藥物】

金属-結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート化治療に用いることができる。



摘 要 の 概 要

1. 組み替えトランスフェリン。
2. 組み替えヒト血清トランスフェリン。
3. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含む、トランスフェリンの組み替え単一分子。
4. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
5. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン単一分子。
6. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、突然変異体の金属に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、突然変異体トランスフェリン単一分子。
7. 鉄に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、請求の範囲6に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
8. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然のトランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲7に記載の突然変異体トランスフェリン単一分子。
9. トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の突出部の結合ドメインを含むトランスフェリン単一分子をコードする核酸を、真核細胞中の発現に用いた遺伝的調節要素と結合させて含む核酸構築物を含む、真核発現ベクター。
10. 核酸構築物がトランスフェリン又はトランスフェリン単一分子をコードする核酸に結合したトランスフェリンシグナル配列をコードする

明 細 書

組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

発明の背景

集合的にトランスフェリン又はシデロフィリンと呼ばれる鉄-結合グロブリンは、著しく高度の純度を有するタンパク質の種類を含む。ヒトラクトフェリン (Anderson, B. F. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1769-1773) 及びウサビ血清トランスフェリン (Bailey, S. et al., (1988) Biochemistry 27: 5804-5812) のX-線結晶学的分析は、これらのタンパク質が短い鎖構造ペプチドにより連結された2個の類似した突出部を含み、各突出部は金属イオン及び補助アミノ酸のための結合部位を含む深い裂け目を形成する2個のドメインを含むことを明らかにしている。

ニワトリオボトランスフェリン遺伝子が形質転換マウス中で発現され (McKnight, G. B. et al., (1983) Cell (Cambridge, MA) 34: 335-341)、ラットトランスフェリンの一部とガラクトシダーゼの融合タンパク質がE. coli 中で発現された (Aldred, A. et al., (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 960-965)。この融合タンパク質を除き、同様にトランスフェリン又は分子の一部を発現する試みは不成功であった (Aldred, A. et al.,

特許を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。

11. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。
12. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲10に記載の真核発現ベクター。
13. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲9に記載の真核発現ベクター。
14. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞系。
15. 請求の範囲9に記載のベクターを用いてトランスフェクションされたベビーハムスター腎臓細胞系。
16. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属-結合ドメインを含むトランスフェリンの組み替え単一分子を、金属の過剰量を下げることによって十分な量で患者に投与することを含む、金属キレート化治療の方法。
17. 金属が鉄である、請求の範囲16に記載の方法。
18. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する突然変異体である、請求の範囲17に記載の方法。
19. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲18に記載の方法。
20. 組み替えトランスフェリンを含む細胞培養細胞のための非血清補剤。

(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 960-965)。おそらくタンパク質の高度に回転状の構造及び分子内の多数のジスルフィド鎖構造がバクテリア宿主中の発現に対する主要な障害であろう。アルカリホスファターゼシグナル配列を付けてタンパク質をバクテリア発現系に向かわせることにより、天然のタンパク質の折り畳み過程を部分的に最小にする試みは不成功であった。

発明の要旨

本発明は組み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの1個の突出部（アミノ-末端又はカルボキシ-末端）の金属-結合ドメインを含む組み替えトランスフェリン単一分子、及びトランスフェリンの発現のための安定な細胞培養系に関する。組み替えトランスフェリンは突然変異形質転換された真核細胞、例えばベビーハムスター腎臓細胞中で発現して全-又は半-分子の形態の基本的に均一な（単分散）材料を与えることができる。本発明は又、天然（野生-型）の形態のトランスフェリンと異なる金属-結合性又は他の性質を有する突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子に関する。これらには鉄又は他の金属への結合が天然のトランスフェリンより強いあるいは弱いかである突然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン単一分子が含まれる。

トランスフェリン単一分子は金属過剰異常症又は金属中毒にかかった患者の治療のための金属キレート化治療に使用することができる。例えばトランスフェリン単一分子、特に天然のトランスフェリンより激しく鉄と結合する突然変異体をサラセミアなどの鉄-過剰負荷患者に投与し、その体から過剰の過剰の鉄を除去することができる。さらに半-分子又

は金属イオン選択性が変えられたその突然変異体を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅又は亜鉛を体から除去することができる。

図の説明

図1はpNUTにおけるhTF/2N複製ベクターの構成を示す。ヒト血清トランスフェリンをコードする2、3-kbのcDNAをヒト肝臓cDNAライブラリから単離し、完全アミノ末端ドメインコード配列を含む1、5-kbのPst I/Hae IフラグメントをM13mp18中にクローニングする。二重鎖鎖停止コドン及びHind III認識配列を特定部位の突然変異誘発により導入し、BamHI/Hind IIIフラグメントの中間を可能にし、それがBamHI/Hpa Iフラグメントと結合するとアミノ末端ドメイン及びNゲル配列をコードした。このフラグメントを高複製ベクターpNUT中にクローニングし、ベクターpNUT-hTF/2Nを得た。このプラスミドにおいてトランスフェリンcDNAはメタロチオネインプロモーター(MT-1 promoter)及びヒト成長ホルモン転写停止シグナル(hGH3')の制御下であり、pNUTはヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルを用いて強制的にFR-cDNA(DHFR-cDNA)の発現を促進するSV40初期プロモーター(SV40)を含む。

図2は、種々のベビーハムスター腎臓細胞系からの免疫沈降物のウェスタンブロットを示す。2n=胚芽細胞培養物からの細胞ライゼート(a)及び胎児(b)の試料を抗-hTF抗血清を用いて沈降させた。形態的なペレットの試料をNaDodSO₄-PAGEにより分離し、ニトロセルロースに移し、抗-hTF抗血清及びその後アルカリホスファ

ターゼ結合抗-iggを用いて染色させた。hGH-pNUT及びhTF/2N-pNUT細胞系を500μMのMTX中で選択し、DMEM/10%ウシ胎児血清中ですべての細胞を培養した。1列、BHK細胞；2列、hGH-pNUTトランスフェクションBHK細胞；3列、hTF/2N-pNUTトランスフェクションBHK細胞。分子重量マーカー(×10³)の位置をプロットの右に示し、追加のM, 37, 000のタンパク質バンドの位置もプロットの右に示す(×37)。

図3はhTF/2Nの形成及びPAGE分離を示す。(パネルA)組み替えhTF/2N(上線)及びタンパク質分解誘導hTF/2N(下線)のPolyanion-SIのカラム上におけるAPLC分離。

(パネルB)分子重量標準(Mr列)及びパネルAからのピークa-dの各3kDaのNaDodSO₄-PAGE(アクリルアミドの5-12%勾配)。(パネルC)FP-LCピークa-d(組み替えhTF/2N種)及びパネルAからのピークe-h(タンパク質分解誘導hTF/2N種)の非還元条件下におけるウレア-PAGE。アポタンパク質(apo)及び統一結合タンパク質(Fc)の位置を示す。FP-LCで用いられた条件は材料及び方法にて示す。FP-LC部分は以下のように集めた：ピークa(留分23-27)、ピークb(28-31)、ピークc(32-38)、ピークd(39-45)、ピークe(28-31)、ピークf(32-36)、ピークg(38-44)及びピークh(46-51)。

図4は10mMのFe(III)(NTA)₃を用いた主要形態の組み替えhTF/2Nの測定を示す。タンパク質の量は1、00mLの10mM NaHCO₃中の3、68A₂₁₀単位であった。電気泳動装置に試料をそれぞれ加えた後5-10分間可視スペクトルを測定した。

図5は組み替えhTF/2Nの核磁気共鳴スペクトルを示す。(a)2Hαのラインブロードニングを用いたフーリエ変換スペクトル。(b)4Hαのラインブロードニング及びDC=4、0、NS=68500における回転差スペクトル(convolution difference spectrum)。タンパク質試料は²H₂O中の0、1M KCl、0、1mL中で8mgであった。

図6はm-Tyr組み替えhTF/2Nの¹³C核磁気共鳴スペクトルを示す。図は10Hαのラインブロードニング、NS=3、000を用いたフーリエ変換を示す。タンパク質試料は²H₂O中の0、1M KCl、0、1mL中で6mgであり、(参照は²H₂O中の0、1Mのメソクサリドであった。

図7はhTF/2Nコード配列の製造のためにPCRプライマーとして用いた2つの別々のオリゴヌクレオチドを示す。金カルボキシ末端部のためのコード配列を含むEcoRI制限フラグメントを、25kDaのPCR増幅の断片として用いた。オリゴヌクレオチド1は3maI認識部位、及び天然のhTFシグナル配列をその5'末端に含み、その3'末端でhTFのアミノ酸334-341のコード配列と合致する。オリゴヌクレオチド2はhTF-cDNAの3'末端認識領域の配列と合致し、この部位に隣接のSmaI認識配列を導入する。

発明の詳細な説明

本発明は組み替えトランスフェリン、組み替えトランスフェリン単一分子、及び天然のトランスフェリン分子と比較して金属-結合能の向上など、性質が変化した金-長トランスフェリン及びトランスフェリン単分子の突然変異体を与える。組み替えトランスフェリンは大量に、及

び実質的に等質の〈単分散〉形態で製造することができる。例えばヒト血清トランスフェリンの組み替え単一分子は、他のヒト血清タンパク質を実質的に含まない基本的な等質の試料として製造することができる。対照的にホータンパク質のタンパク質分解により製造された単一分子は複製が困難で、実際にヒトトランスフェリンのカルボキシ末端半分をタンパク質分解の手段により満足に製造することはできない。組み替え法は、トランスフェリンの新規形態の設計及び製造に突然変異誘発を適用することも可能にする。

一般に本発明の組み替えトランスフェリンは、トランスフェリンをコードする核酸構築物を用いて選んだ宿主細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション宿主細胞を突然変異に適した条件下で培養し、細胞により発現された組み替えトランスフェリンを回収することにより製造される。3種類のトランスフェリンのアミノ酸配列が報告された(Jaitsch, J., M. and Chabon, P. (1982) Eur. J. Biochem. **122**: 291-295; McGilli-vray, R. T. A. et al. (1983) J. Biol. Chem. **258**: 3543-3553; Metz-Boutigue, M.-M. et al. (1984) Eur. J. Biochem. **145**: 655-676; Rose, T. M. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 1261-1265; Baldwin, G. S. and Wornatlock, J. (1988) Nucleic Acids Res. **16**: 8720-8730)。ヒト血清トランスフェリンのcDNA配列が決定された(Yan, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. S

c4. USA 8.1: 2752-2756)。組み替えトランスフェリンの製造のための全一長DNA又はトランスフェリンあるいはその一部のアミノ末端又はカルボキシー末端突出部のいずれかをコードする切断DNAを、利用できる供給源から得ることができるか、又は標準的方法により既知の順序に従って合成することができる。組み替えトランスフェリンを細胞培養中に分泌させるために、トランスフェリンシグナル配列（又は発現系に属した他のシグナル配列）をコードするDNAをトランスフェリンコードDNAの上流に置く。

トランスフェリンをトランスフェリン単一分子の突然変異体を、特定部位の突然変異誘発の標準的方法により製造することができる。Taylor et al. (1985) Nucleic Acids Res. 13: 8749-8764; Zoller, M. J. and Smith, M. (1988) Meth. Enzymol. 100: 458-500を参照。特に突然変異誘発を用いて天然のトランスフェリンと異なる金属結合性を有する突然変異体トランスフェリンを製造することができる。例えば、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合することができる突然変異体を製造することができる。そのような突然変異体の製造のためには、金属一結合ドメインの突然変異を誘発し、結合に含まれる1個又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換する。ヒト血清トランスフェリンの場合の金属キレート化のためのリガンドであるアミノ酸を下記に示す（アミノ酸の横の番号は一次配列中のアミノ酸残基の位置を示し、その場合成熟タンパク質の第1ペプチドを位置1と決定する）。

アミノ末端側山部

カルボキシル末端突出部

鉄の酵素をコードする。これにより、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度（0.5 mM）のストレッキセート中で直接選択することが可能になり、ジヒドロホレートレグラーゼの不足した受容性細胞株の必要性を廃する。pNUTはpUC18誘導配列も含み、それによりpNUTがE. coli中で増殖されて受容性細胞のトランスフェクションのために十分な量のプラスミドを与えることができる。

トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターは、適した宿主細胞中に導入される。好ましい宿主細胞は、ベクターを用いて形質転換され、遺伝的に持続的トランスフェリン構築物を発現する安定な細胞株を与えることができる哺乳動物である。特に有用な細胞はベビーハムスター腎臓細胞である。ベビーハムスター腎臓細胞は、トランスフェリンをコードするDNA構築物を有するベクター（例えばpNUTなど）を用いてトランスフェクションされ、遺伝的に持続的トランスフェリン（全又は単一分子）を発現し、分泌する安定な細胞培養系を与えることができる。これらの細胞は経済的な大規模生産に十分適しており、容易に利用できる供給源から得ることができる。

リン酸カルシウム共沈又はエレクトロポレーションなどの標準的方法を用い、異体宿主細胞をベクターでトランスフェクションすることができる。その後細胞を、トランスフェリンの発現を誘導するのに適した条件下で培養する。例えばpNUTベクターを用いてトランスフェクションしたベビーハムスター腎臓細胞を、鉄金属の存在下で刺激し、トランスフェリン構築物を発現させることができる。ベビーハムスター腎臓細胞は、血清濃度11 (raser-GTM (Gibco)) を約1%を含むDulbeccoの改良DMEM培養液（Ham's F-12栄養剤

（アミノ酸1-837）

アスパラギン酸	68	アスパラギン酸	392
チロシン	95	チロシン	426
チロシン	188	チロシン	519
ヒスチジン	249	ヒスチジン	584

他の種類のトランスフェリンの場合、番号が異なりリガンド（アミノ酸）は同一である。

トランスフェリンの他の領域は結合を制御し、これらも突然変異誘発の標的となることができる。通常これらは既に誘導したアミノ酸、例えばリシン、ヒスチジン又はアルギニンである。例えば天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン単一分子は、206位のリシン残基をグルタミンで置換することにより（AAG→CAG）製造することができる。

トランスフェリンコードDNAを、DNAの発現を指示するための適した調節要素を含む発現ベクター中にクローニングすることができる。好ましい真核発現ベクターはPalmer, R. D. et al. (1987) Cell 50: 405-412により記載されたプラスミドpNUTである。このプラスミドはプロモーター領域を含み、それは重金属及びヒト成長ホルモンの転写停止シグナルの存在下におけるトランスフェリンコードDNAの転写物を含む。さらにpNUTは、細胞培養物中における選択を可能にするためのヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルと共にSV40初期プロモーターの制御下にあるジヒドロホレートレグラーゼ遺伝子を含む。遺伝子は、競争的阻害剤メトトレキサートに対する選択圧が270倍近い突然変異

混合物の培養中で培養するのが好ましい。

適した培養期間の後、発現され、分泌されたトランスフェリンを培養から回収することができる。標準的精製法を用いて組み替えトランスフェリンの実験的に精製の試料を得ることができる。1つの具体化の場合、培養中のトランスフェリンに鉄を飽和させ、その後アニオン交換クロマトグラフィーにより精製する。

本発明の組み替えトランスフェリンは、鉄又は他の過剰金属とキレート化し、体から除去するのに用いることができる。生体内の鉄キレート化の通常の方法は、微生物起源の天然に存在する多様なシデロフォア及び合成鉄キレート剤を、その生理学的効果、主に鉄と結合して体から除去する能力に基づき評価することであった。このような化合物の多くが研究され、鉄の除去の能力は様々であり、多くの場合有害な副作用があった（Piet, C. G. et al. (1979) J. Pharm. Exp. Therap. 208: 12-18）。その結果、ヒトから過剰の鉄を除去するために用いられるキレート剤として、ストレプトミセス・ピロシス (Streptomyces pilosus) から抽出されたペプチドであるデフェロキサミンのみが残っている。

鉄キレート化結核に好ましいトランスフェリンは、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン単一分子である。突然変異体単一分子の初用により、金属のより有効なキレート化及び除去が可能になる。特に好ましい突然変異体単一分子は、下記の突然変異に起因するK206Gであり、これは206位にリシンではなくグルタミンを含む。トランスフェリン単一分子は、ホロタンパク質と異なり腎臓の糸球体を通過し、尿中に排泄され、従って金属がキレート化さ

れるのみでなく体から除去されるので有利である。さらに原核の単一分子は細胞細胞の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの細胞に鉄を輸送しない。さらにヒトトランスフェリンの単一分子はおそらくヒトの体により「自己」と認識され、従って免疫学的応答を引き起こさない。

さらに突然変異体単一分子は、金属イオン選択性が異なるように設計することができる。キレート化剤を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅及び亜鉛を体から除去することができる。

キレート化治療の場合、金属をキレート化して溶解度を毒性値以下に下げること十分な量で組み替えトランスフェリンを患者に投与する。一般にこれは生薬学的に許容し得るレベル、例えば食塩水中で、希釈口飲経路で（典型的に静脈内）投与する。

組み替え金〜及ヒトトランスフェリンは、細胞培養培地のための非血漿補添物中で使用することができる。トランスフェリンは成長細胞による鉄吸収に必要である。組み替えトランスフェリンの使用により、ヒト細胞から精製したトランスフェリンに伴う汚染物（例えばHIV又は肝炎ウイルス）の危険を避けることができる。

本発明を以下の実施例によりさらに例示する。

実施例

1. アミノ-末端突出部を含む組み替えトランスフェリン単一分子の製造

材料

T4 DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI（クレンワフラグメント）及びT4ポリヌクレオチドキナーゼは、Pharmacia-PL

58:8389-8394)中に精製されたヒト肝臓cDNAライブラリを、血清hTFのアミノ-末端8アミノ酸をコードする合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドはYang, P. et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2752-2756により報告されたhTF cDNA配列のヌクレオチド88-133に対応した。オリゴヌクレオチドはす4ポリヌクレオチドキナーゼ及び³²P-ATPを用いて末端-標識し (Chacones, G. and van de Sande, J. H. (1980) Methods Enzymol. 65:75-85)、約10⁵個のコロニーのスクリーニングに用いた。陽性のクローンの制限エンドヌクレアーゼマッピング及びDNA配列分析を、それぞれpUC19及びM13mp19ベクターを用いて標準的方法で行った (Maniatis, T. et al., (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1983) Methods Enzymol. 101:20-78; Sanger, F. et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467)。

発現ベクター及び細胞培養 異接発現ベクターpNUT (Palmiter, R. D. et al. (1987) Cell (Cambridge, MA) 50:435-443)及びペーハムスター腎臓 (BHK)細胞はDr. Richard D. Palmiter (Iowa

Biochemicalsから購入した。制限エンドヌクレアーゼはPharmacia PL Biochemicals及びBethesda Research Laboratoriesから購入した。オリゴデオキシリボヌクレアーゼは、Applied Biosystems 280A DNA合成機上で合成した。ミクロセルコースポルターは、Schleicher and Schuellから、³²P-標識ヌクレオチドはNew England Nuclearから、ヒツジ抗-ヒトトランスフェリン血清はSigma Chemical Companyから、ホルマリン-固定スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) 細胞は、Bethesda Research Laboratoriesから、プロトゾット (Protobiot) 免疫スクリーニング検出系はPromegaから、オリゴヌクレオチド-指示 (oligonucleotide-directed) 突然変異誘発キットはAmershamから、Dulbeccoの修正必須培地及びウシ胎児血清はGibcoのから、及び抗-ヒトトランスフェリンモノクローナル抗体HTF-14はCzechoslovakian Academy of Scienceから得た。他の試薬はすべて分析用か又はそれ以上の純度であった。

方法

ヒト血清トランスフェリン (hTF) cDNAの単離 Dr. Severe Grkin, (Harvard University) 提供によるE. coli 発現ベクターpGT-218 (Prochownik, E. V. et al., (1983) J. Biol. Chem. 2

ed Hughes Medical Institute, University of Washington) の提供による。合成後、オリゴヌクレオチドをC₁₈逆相カラム上で精製した (Sep-Pak, Waters Associates; Atkinson, T. and Smith, M. (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, M. J., Ed.) pp26-81, IRL Press, Oxford). Taylor, J. W. et al., (1985) Nucleic Acids Res. 13:5749-5764の方法を用いることにより、特定部位の突然変異誘発を行った。プラスミドDNAは、E. coli JM105から調製し、塩化セシウム密度勾配を用いた2連続遠心分離により生成した。

BHK細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDulbeccoの修正必須培地 (DMEM) 中で10-cmの皿当たり約10⁷細胞に成長させ、続いてSearle, P. F. et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489に記載のリン酸カルシウム法により10μgのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞を100μMのメトトレキサート (MTX) を含むDMEMに変え、生存細胞を500μMまで断重に選別した。いくつかの実験では300μMのMTXを直接用いて細胞を選別した。大規模の回転培養は、100mLのDMEM-MTXを含むそれぞれ850cm²の回転培養中に約5 x 10⁷個の細胞を播種して開始した。ZnSO₄を0.38mMの最終濃度まで培養に加えることにより80%の集密度にて培養物を誘導した。細胞を48時間後に収穫した。

免疫沈降及びウェスタンブロッティング 細胞培養培地及び細胞ライケートの免疫沈降を、Van Oost, B. A. et al. (1986) Biochem. Cell Biol. 54: 699-705の方法により行った。沈降物をNaDodSO₄の存在下における12%ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分析し(Laemmli, U. K. (1970) Nature (London) 227: 680-685)、その後ニトロセルロース膜上にブロッティングした。ブロットを0.1mg/mlのゼラテンを含むPBS中でインキュベートし、その後ヒツジ抗-hTF抗血清(PBS中で250倍希釈)を用いて処理し、最後にアルカリホスファターゼ-標的ウサギ抗-hTF IgG抗体を用い、保結剤の指示に従って発色した。

アミノ酸選抜 3-フルオロチロシンを組み替えhTF/2N中のhTF NMRプローブとして挿入するため、培養培地に培地中1%のL-チロシン濃度でD, L-m-フルオロチロシン(Sigma Chemical Company)を添加した。細胞はD, L-m-フルオロチロシンのない培地と同様にこの培地でも十分に成長した。

組み替えhTF/2Nの単離 収穫した培養細胞をフェニルメチルスルホニルフルオリド中で0.01%としてプロテアーゼを阻害し、培地中のトランスフェリンのすべてを凝結させるのに十分なFe(III)(NTA)₃を加えた。密着で攪拌した後、溶液を冷水透析水に対して24時間、その後M:1:1-0.1Mの透析液に対して長時間透析した。凍結トリス-HCl緩衝液、pH8.4を5mMの最終濃度まで加え、試料を遠心して管底を除去し、10mMのトリス-HCl緩衝液、pH8.4で平衡化したDEAE-Sepharose 1 (Pharmacia)のカラム(2.5×80cm)に直接した。

873)に従ってウレア-PAGEを行った。110mMのガラスカラム(LKB)中の0-50%スクロース勾配上で0.5%のPharmalyte, pH5-8 (Pharmacia)を用いて板点電気泳動を行った。カラムは1000Vにて2mAの最終電流に恒電流運転させた。

0.2ml中の試料を勾配の半ばから回収した5mlの溶液で希釈した。その後試料をカラムの等高度領域に再注入し、量度を24時間続けた。加圧をカラムの底から1.5mlの留分を採取した。各留分をA₂₈₀及びpHに関して分析した。最高A₂₈₀を有する留分を、アポ-及び脱-飽和タンパク質のpIを基準として選択した。

洗は、1mMのNTA、1mMのEDTA、0.5Mの酢酸トリウムを含む緩衝液、pH4.5中でインキュベートすることにより、脱-タンパク質から容易に除去できた。アポ-タンパク質をCenricor 10 (Amicon)上で最小体積に濃縮し、その後水を用いて2回、及び0.1NのKClを用いて2回希釈して再濃縮した。アポ-タンパク質は純水中で沈殿する傾向があるが、0.1MのKCl中に容易に再溶解した。アポ-タンパク質をNaHCO₃中で10mMとし、465nmで吸光度を監視しながら薄した濃度のpH(NTA)₃で調整した。

組み替えhTF/2Nの定量的免疫検定 競争的間相免疫検定を用い、精製の様々な段階で培養中の組み替えhTF/2Nの濃度を評価した(Foster, W. B. et al. (1982) Thromb. Res. 28: 649-661)。タンパク質分解-標識Fe-hTF/2N(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. 255: 700-713)を用いて放射ヨウ素化し(Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 848-857)、標準として用いた。モノクローナル抗-hTF抗体であるHTF-14をプローブとして用いた(Boritsky, J. et al. (1984) Polym. J. Biol. Chem. 30: 137-140)。この抗体はhTFのアミノ末端残基のみを認識し(Mason, A. B. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 158: 882-893)ウシトランスフェリンを認識しない(Pennell, R. C. et al. (1988) J. Cell. Physiol. 128: 251-260)。

その後カラムを同緩衝液中のNaClの直線勾配(0-0.3M)を用いて洗脱した。ピンク色を示す留分をNaDodSO₄-PAGEにより分析し、組み替えタンパク質(Mr37,000)を含む留分を集めた。そのような留分は、細胞培養培地中のウシ胎児血清からのラントランスフェリン及びアルブミンも含む。集めた留分をAmicon PM-10膜上で5mlに濃縮した後、タンパク質を、100mMの酢酸水素アンモニウムで平衡化したSephadex G-75 Superfine (Pharmacia-PL Biochemicals)のカラム(2.5×90cm)上のクロマトグラフィーにかけた。

タンパク質からhTF/2Nを完全に分離するため、このカラムを通して2回目のクロマトグラフィー段階が必要な場合がある。この段階でA₂₈₀/A₂₆₀は通常<3.0であり、汚染ヘモグロビン(おそらくヘモグロビン)の存在を示している。hTF/2Nは、50mMのトリス-HCl、pH8.0中のNaClの直線勾配(0-0.3M)を用いたPolyion S1 (Pharmacia)のカラム(1×100cm)上で1ml/分の流量にて1時間かけたPPLCにより最終的に精製して凍結にした。1mlの留分を採取した。タンパク質の脱-結合状態に依存して2-4個のタンパク質バンドがカラムから現れた。

5%-12%勾配ゲルを用いてNaDodSO₄-PAGEを行い、Makay, D. G. and Seef, U. S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 452: 250-256の方法の修正版(Brown-Mason, A. and Woodward, R. C. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1873)を用いて放射ヨウ素化し(Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 848-857)、標準として用いた。モノクローナル抗-hTF抗体であるHTF-14をプローブとして用いた(Boritsky, J. et al. (1984) Polym. J. Biol. Chem. 30: 137-140)。この抗体はhTFのアミノ末端残基のみを認識し(Mason, A. B. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 158: 882-893)ウシトランスフェリンを認識しない(Pennell, R. C. et al. (1988) J. Cell. Physiol. 128: 251-260)。

アミノ末端配列分析 組み替えhTF/2Nの非主要形態及び主要形態両方のアミノ末端配列をUniversity of VermontのGiven Analytical FacilityにてApplied Biosystems 470A Protein Sequencer上で決定した。

アミノ末端配列分析 組み替えhTF/2Nのオリゴ糖の存在を、タンパク質を過ヨウ素酸-シッフ試薬で染色することにより決定した(Fairbanks, G. et al. (1971) Biochemistry 10: 2605-2617)。

核磁気共鳴スペクトル Camille and Henry Dreyfus NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermont

entにおける5.872 Teiaa Bruker WM NMR
 スペクトロメーターにて、双極検出 (quadra-
 lure detection) を用いたフーリエ変換モードで操作してプロトン及びフッ
 素NMRスペクトルを得た。¹⁹Fプローブはその部門のDr. Chris-
 topher W. Allenにより提供された。プロトンスペク
 トルの場合、スペクトロメーターの設定は前記の通りであった (Valc-
 our, A. A. and Woodward, R. C. (1987) Biochem. Soc. Trans. 15: 3120-3125)。¹⁹Fスベク
 トルの場合、感度は30,000Hzであり、アキュエジョン時間は
 0.27秒であり、アキュエジョンを15,015 (90°) のパル
 スの間に2.0秒のレシーバーデレー (receiver delay)
 が介在し、感度は308°Kであった。¹⁹F化学シフトは²H₂O中の0
 14の三フッ化酢酸に対する。タンパク質試料は0.1mlの98.8
 原子%²H₂O中の6-8mgであり、スペクトルは²H₂Oを含む溶液約
 5mm NMR管に挿入されたり、1mlのカプセル中のこれらの試料
 につき測定した。¹⁹Fスペクトルの自由誘導減衰 (free induc-
 ed decay) につき、フーリエ変換の前に10Hzのサイ
 ンブロードニングを行った。

結果

ヒトTF- α DNAの単離。 ハイブリッド形成プローブとしてヒト
 TF- α DNAの5' 配列への24塩基オリゴヌクレオチドを用い、ヒ
 ト胚盤 α DNAライブラリ (Prochownik, E. V. et al. 1
1, (1983) J. Biol. Chem. 258: 8389-8394) の約100,000倍のコロニーをスクリーニングした。1個の陽

cell 中でpUC18配列の複製及び選択を可能にし、SV40初期
 プロモーターにより誘導されたジヒドロ酸レダクターゼ (DHFR)
 α DNAの細胞培養物における選択を可能にすることが含まれる。DH
 FR α DNAは、競争的阻害剤メトトレキサート (MTX) に対する耐
 性力が270-倍強い細胞の突然変異株をコードする (Simons-
 on, C. C. and Levinson, A. D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499)。
 これは、トランスフェクションされた細胞を非常に高濃度 (0.5mM)
 のMTX中で選別選択することを可能にし、DHFRの不足した感受性
 細胞系の必要性を廃する。

発現ベクターpNUT-hTF/2Nの構築のために、バクテリア発
 現ベクターからBamHI-HindIIIフラグメントを単離した
 (図1)。最初のトランスフェレン α DNAクローンからのHpaI
 -BamHIフラグメントも単離した (図1)。その後これらの2つの
 フラグメントを、AccI及びHindIIIを用いて切断したHpaI
 18複製可能形態DNA中に導入した。得られた約23ページか
 らの複製可能形態DNAを単離し、XbaI及びHindIIIを用い
 て切断することにより挿入片を放出させ、末端を平滑末端とした。これ
 らの段階は、フラグメントが翻訳停止シグナルを含み、タンパク質のた
 めの天然のシグナル配列を保持し、最初のベクター中にあるdG/dC
 配列を含まないことを保証する (図1)。このフラグメントをSmaI
 -切断pNUT中に挿入し、かくしてヒト成長ホルモン遺伝子からhTF
 /2Nコード α DNAと置換されるが成長ホルモン遺伝子からの転写停
 止シグナルはそのままだ。このプラスミドをBHK細胞中にラン

性のコロニーを得た。このプラスミドから単離されたプラスミドの成績
 (extensive) 800塩基マッピングは、Yang, F. et al.
21, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2752-2756により同一のライブラリから単離されたヒト
 TF- α DNAから予想されたパターンと完全に一致した。このクロー
 ンの5' -及び3' -末端のDNA配列分析は、それがYang et al.
21, により単離された全一長クローンと同一であることを確認した。
 この α DNAの突然変異検出及びサブクローニングの際に行われるその
 の配列分析はすべて以前に報告された配列に正確に従った。

ベクター構築及び結果。 2箇の翻訳停止コドン及び3箇のHind
 III認識部位をhTF- α DNA配列のアミノ-及びカルボキシ-末
 端ドメインの間のリンカー領域に、オリゴヌクレオチド-指示突然変異
 誘発により導入した。この構築物からの推定翻訳配列は、血漿hTF
 番号付け配列に類似A₅₉-337で終わる (MacGillivray,
 R. T. A. et al. 21, (1983) J. Biol. Chem. 258: 3543-3553)。

発現ベクターpNUT (Palmiter, R. D. et al. (1987) Cell (Cambridge, MA) 50: 435-443)
 はマウスマクロネイン-1/ヒト成長ホルモン遺伝子融合物を組み、
 これは胎腎転換マウスにおいて多量のヒト成長ホルモンを指示すること
 が示された (Palmiter, R. D. et al. (1983) Science (Washington, D. C.) 222: 809-814)。
 このベクターの重要な機能的特徴には、マウスマクロネイン-1プロモーターに重金属の存在下で α DNA転写を誘導させ、E.

スフレクションし、得られた胎腎転換物をMTXの存在下で選択した。

トランスフェクションされたBHK細胞により製造されたmRNA転
 写物の分析のために、ホルムアルデヒドの存在下のアガロースゲル上で
 α mRNAを電気泳動させた (Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニ
 トロセルロース上に移した後、ハイブリッド形成プローブとしてhGH
 遺伝子の3' 非翻訳領域に対するオリゴヌクレオチドを用いてブロット
 を分析した。トランスフェクションされた細胞系で約1.4kbの誘導
 mRNAが検出されたが、複製-感染BHK細胞では検出されなかった
 (データは示していない)。これはhGH3' 非翻訳配列及びポリ(A)
 尾部を含むhTF/2N-mRNAの推定サイズと一致した。

胎腎転換されたBHK細胞により製造されたポリペプチドの分析のた
 めに、様々な細胞系の細胞ライセート及び培養の両方につきウェスター
 ブロット分析を行った (図2)。BHK細胞、hGH-pNUTプラ
 スミドを含むBHK細胞及びhTF/2N-pNUTプラスミドを含む
 BHK細胞の試料をDMEM (BHK細胞) 又はDMEM-MTX (p
 NUTベクターを含むBHK細胞) 中で培養した。細胞が非常に濃した
 培養地の試料を採取し、細胞ライセートを調製した。これらの試料を順
 にヒツジ抗-hTF抗血清及びホルマリン-固定S-アウレウス (S.
 aureus) 細胞と共にインキュベートした (Van Ooche, B.
 A. et al. (1986) Biochem. Cell Biol. 64: 699-706)。

Page 10 of 10.）と共にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させ、エトロセルロース膜に移すことにより結合タンパク質を固定した。その後膜をヒツジ抗-hTF抗体清液及びアルカリホスファターゼと標化したウサギ抗-ヒツジ免疫グロブリンと共にインキュベートした。BHK細胞からの細胞ライセート又は培地（図2、1a列及び1b列）、あるいはhGH-pNUTプラスミドを含むBHK細胞からの細胞ライセート又は培地（図2、2a列及び2b列）を分析すると、最初のヒツジ抗-hTF抗体から予想されるヒツジ免疫グロブリンバンド（Mr = 25, 000及び30, 000）及び少量の交叉反応物質のみが観察された。しかしhTF/2N-pNUTプラスミドを含むBHK細胞の細胞ライセート（図2、3a列）又は培地（図2、3b列）中に、さらにMr = 37, 000のバンドが観察された。このポリペプチド鎖の分子量は、アミノ酸配列から算出されたhTF/2N分子の分子量（37, 838）と非常に一致している。

hTF/2N生成物の等質性は、SDS-PAGE上で細胞ライセート及び分泌材料が共移動した際のシグナル配列の除去の成功を示す。沈降物中にはhTFがほとんど現れないので抗-hTFはhTFに特異性が高いことがわかる。

回転瓶で育成されるhTF/2N細胞系の大規模培養の場合、培地中のhTF/2Nの濃度はラジオイムノアッセイにより検出して約10-15 ng/mlであった。

組み替えhTF/2Nの単離及び特異性 組み替えhTF/2Nを3段階法により精製し、それはラジオイムノアッセイに基づいて30%の収率の主要形態のタンパク質を日常的に与える。Purification

TF/2Nの場合のpIはそれぞれ6.5及び6.4であった。

非主要及び主要形態の両方の組み替えhTF/2Nのアミノ酸配列分析は、血清からのホモ-hTFの場合に見いだされた結果と同一の結果を与えた(MacGillivray, R. T. A., et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 8548-8553) (表1)。

組み替えタンパク質のプロトンNMRスペクトル（図5）は、タンパク質分解-誘導hTF/2Nのスペクトルと非常に似ている (Valicour, A. A. and Woodward, R. C., (1987) Biochemistry 26: 3120-3125) が、組み替えタンパク質の場合の方が共振線は鋭い。m-Fe-チオンを抽出した培地上で育成した細胞培養物から精製したタンパク質の⁵⁷Fe-NMRスペクトル（図6）は、4つの十分に分離した共振を示し、2つはおそらく未分離シオルダーを有する。

表1

ヒトトランスフェリン及び組み替えヒトトランスフェリンアミノ末端アミノ酸配列

タンパク質	アミノ酸配列	参照
ヒト血清トランスフェリン	V-P-D-K-T-V-R-R-C-A-S-S-	MacGillivray <u>et al.</u> (1983)
組み替えhTF/2N (主要)	V-P-D-K-T-V-R-R-S-A-V-S-	本報告

Si上の最終的複製は、ウレア-PAGE（図3、パネルC）により確認される通り、タンパク質の非主要成分（＜636）及び主要成分（図3、パネルA）の両方のアボ-及び統一糖形態を定量的に分解した。ウレア-PAGE上で最も移動の遅いバンドはアボ-hTF/2Nであり、移動の遅いバンドはFe-hTF/2Nであることに注意してほしい。SDS-PAGEゲル（図3、パネルB）は、主要形態及び非主要形態の組み替えhTF/2Nが、等分子量の単分位であり、主要成分がPAS染色により炭水化物を含まない（データは示していない）ことを示した。

一般にこれらの図は、原成的誘導hTF/2Nより優れた単分位性を有するようである (Lineback-Zins, J. and Brew, K., (1980) J. Biol. Chem. 255: 708-713) (図3)。例えばクロマトグラフィーのピークは前者の場合の方がより規則的であり、ウレア-PAGE上のバンドの数は後者の方が多い。統一糖和組み替えタンパク質の場合のスペクトル比は、典型的にA₂₈₀/A₄₄₀=2.1及びA₄₄₀/A₄₁₆=1.38であり、これにヒト血清から単離された純粋なトランスフェリン二糖の場合に優るとも劣らない。Fe(NTA)₂を用いたアボ-タンパク質の3.68A₄₄₀単位の測定は、E₄₄₀mM=2.1に対応する傾斜を与え、アボ-タンパク質のE₄₄₀mM=38.8を示し（図4）、両方共、単一トランスフェリン分子として合理的な値である (Lineback-Zins, J. and Brew, K., (1980) J. Biol. Chem. 255: 708-713; Zak, G. et al. (1983) Biochim. Biophys. Acta 742: 490-495)。アボ-及びFe-h

組み替えhTF/2N (非主要)

組み替えhTF/2N配列は、Applied Biosystems 470Aタンパク質シーケンサー上で決定した。約200pモルの各試料を分析した。*12シーケンサーサイクルを分析した。*サイクル9で残基は同定されなかった；しかし分析の前にはシステイン残基は修飾もなかった。*8シーケンサーサイクルを分析した。

組み替えDNA法を用いることにより、いくつかの独立した基準で判断してタンパク質分解により誘導された種と同一の環境を築すhTF/2N分子を製造する。これは、この重要な鉄輸送タンパク質の機能的活性形態の、安定な細胞培養系における発現の初めての報告となる。

本文に記載のpNUTに基づくhTF/2N複製により、DMS-不足細胞系又は冗長な副産物増殖法を必要とせずに多量の組み替えタンパク質が製造された。BHK細胞は経済的大規模育成に十分適しており、現在我々はペイオリフクター容器中の微量担体上の育成特性を試験中である。数リットルの容量を有する回転瓶又は発酵器のいずれかを用いることにより、従来不満足なタンパク質を必要としてきたNMRのような方法にさえ十分な組み替えタンパク質を容易に製造することができる。

Polyanion-Si上で単離された非主要形態の組み替えhTF/2Nは、ウレア-PAGE上の移動が主要形態より遅い（図3、パネルC）が、SDS-PAGE（図3、パネルB）上では同速度である。従って見掛けの分子量は同一であるがMウレア中の変性の相対的程度が異なる。タンパク質分解-誘導アボ-hTF/2Nは6Mウレア中で

も移動の違い種を承すことに注意して頂しい(図3、パネルC、部分g及びh)。

これらのゲル上での $A \rightarrow T$ / $2N$ によるアミノ \rightarrow hT \rightarrow 2Nの汚染及びその逆は、FPLC部分の収集液、フレイズル上における結合液のいくらかの損失、及びFPLC試料の仕上げの際の汚染液の希釈から生ずる。同一のN-末端配列(表1)は、シグナルペプチドが非主要及び主要形態の組み替えタンパク質の両方から除去されたことを示す。ヒト血清からのhT \rightarrow 2Nの場合と同様に(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713)、組み替えhT \rightarrow 2Nは非-グリコン化である。hT \rightarrow 2Nの主要形態及び非主要形態の差の理由は現在未知である。非主要形態は合併の組み替えタンパク質の5%以上とならず、通常1%以下である。従って単分組組み替えhT \rightarrow 2N(主要形態)の単離の目標は達成された。

組み替えhT \rightarrow 2Nの鉄結合移動、pI、NaDodSO₄-PAGE及びウレアーPAGE上の移動、ならびにプロトンNMRスペクトルは、ナモリレンを用いたタンパク質分解によるアミノ末端hT \rightarrow 1酸から誘導されたhT \rightarrow 2Nのものと、上記の点を除いて十分合意的に一致する(Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) J. Biol. Chem. **255**:708-713; Valskov, A. A. and Woodward, R. O. (1987) Biochemistry **26**:8120-3125)。タンパク質分解により誘導されたhT \rightarrow 2Nより主要形態の組み替えタンパク質は単分組能が高く(図3)、そのプロトンNMRスペクトルは鋭い

共振線を示す。非主要形態の電荷NMRによる分析には不十分であった。

5. collからのアルカリホスファターゼ中へのm-フルオロロホシンの挿入の以前の研究は、タンパク質中のチロシル残基を特異的に標識するための¹⁴C-NMRの有用性を確立した(Sykes, B. D. et al. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**:469-473; Hull, W. E. and Sykes, B. D. (1974) Biochemistry **13**:3431-3437)。組み替えhT \rightarrow 2N中へのm-フルオロロホシンの挿入により、この細胞培養系において選択的アミノ酸置換が可能であり、チロシル残基の特異的NMRプローブへの方法を与えることが証明された。この材料は非-置換組み替え体に関して上記で記載した通り、非-脂肪タンパク質とすべての点で同様に振動する。多量の挿入の達成のために細胞培養条件を最適化した場合、常磁性及び反応性金属を添加した時、及びpHを変化させた時の¹⁴C-NMRスペクトルの変化は、金属結合に特異的に含まれるチロシル残基の研究に有用であろう。選択的にジ-テリウム化した腎臓族アミノ酸の挿入は、日本ウズラからのウズチームに関する研究と同様の方法でタンパク質のプロトンNMRスペクトルの芳香族領域の分析を可能にするであろう(Brown-Mason, A. et al. (1981) J. Biol. Chem. **256**:1506-1509)。

11. カルボキシ末端突出部を含む組み替えトランスフェリン半-分子の製造

hT \rightarrow 2Nのカルボキシ突出部のコード配列を含む5'制限フラグメントを、全長hT \rightarrow 2Nから単離し、PCR-指示突然変異誘

発の特色として用いた(図2)。PCRプライマーとして用いるために2個のオリゴヌクレオチドを含成した。オリゴ1は、SmaI認識部位をコードし、hT \rightarrow 2Nの天然のシグナル配列をコードする配列が続き、アミノ酸334-341のコード配列と合致する配列が続いた。第2のオリゴヌクレオチドはhT \rightarrow 2Nの3'非翻訳領域の塩基体と合致し、正常な翻訳停止部位にSmaI認識配列3'を導入する。(Vasong, P. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:2762-2766による番号付けを用いてヌクレオチド2125-2127)。Tagポリメラーゼ(Parklin Elmer)を用いた25塩基のPCR増幅は、所望のDNAフラグメントを与え、それはhT \rightarrow 2Nの天然のシグナル配列をC突出部コード配列にスプライシングする。このフラグメントをその後SmaIで消化し、hT \rightarrow 2N発現研究の場合と同様にhT \rightarrow 2Nの6SmaIフラグメントと連結した。

11.1. 組み替え全長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためのコード配列を、上記のヒト肝臓ライブラリから単離した全長cDNAクローンから誘導した制限酵素消化フラグメントから組み立てた。最初のクローンの基となるプラスミド(pMT-218)のユニーク制限酵素認識部位の数が限られていたため、簡便なベクター中にコード配列を導入するために一連のクローニング段階が必要であった。この過程は、cDNAの3'末端からのHpaI / BamHIフラグメントのベクターpMT-18へのクローニングにより開始された(Messing, J. (1983) Meth. Enzymol. **100**:20-28)。得られたプラスミドをBamHI

1及びHindIIIで消化し、ヒトトランスフェリンcDNAからのBamHI / HindIIIフラグメントを最初のフラグメントに挿入してクローニングした。得られたプラスミドをその後HindIII及びPstIで消化し、トランスフェリンcDNAの3'末端からの最終HindIII / PstIフラグメントをクローニングし、全長コード配列の組み立てを完了した。N-及びC-末端トランスフェリン半-分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドをSaeI及びSphIで消化すると、1個の制限フラグメントとして全長コード配列を放出し、続いてそれをTag-DNAポリメラーゼ及びdTTPを用いて増幅化し、その後cDNAの6SmaIフラグメントにクローニングした(Parklin et al. (1987) Cell **50**:435-448)。

プラスミドDNAはE. coli JM105から脱酸し、塩化セシウム勾配を用いた2連続直心段階により精製した。ペピーハムスター腎臓(BHK)細胞を、10%の牛胎児血清を含むDulbeccoの修正Eagle培養地-Ham's F-12栄養剤混合物(DMEM-F-12)(Gibco:Sigma)中で100mmの皿当たり約10⁷細胞に産出し、続いてSerice, P. F. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:1489-1489に記載のリン酸カルシウム共沈法により10⁶のプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、培地を500 μ Mのメトトレキサート(MTX)を含むDMEM-F-12に置き、プラスミド含有細胞を選別した。選別したら、cDNA(0.2 μ g/ μ l)を含むリン酸緩衝液増殖液を用い、細胞を約30%の集密度にて5個の100mm皿に、

その後5回のT-175プラスコに、最後に5倍の塩酸価隔回転瓶（それぞれ200ml）に併置に通過させた。T-175通過の際に、フェノール赤を含まないDMEF-12中のウシ胎児血清の代わりに血清添加、Ultraser-G(Gibco)を1%の量で用いた。

1度生体量が高くなると（約100μg/ml増殖）、Ultraser-Gを含まない培地が少なくとも2回通過の間、組み替えタンパク質の製造を維持できることが見いだされた。これは発現された金一長組み替えヒト胎児トランスフェリンの純度を非常に簡略化した。組み替えタンパク質の精製のために、収穫した培養増殖をフェニルメタンスルホニルフルオリド及びナトリウムアジドに関して0.01%とし、それぞれプロテアーゼ及びバクテリア成長を阻害する。浮遊するトランスフェリンの飽和に十分なFe²⁺（ニトロトリ酢酸）を加える。培地の体積を<10mlに減少させ、組み替えアミノ酸類にヒトトランスフェリン単一分子に関して記載したアニオン交換カラム（Polyanion SL, 1×10cm）上を通過させることにより精製する。上記参照。

単離された組み替え金一長ヒト胎児トランスフェリンはこのカラム上で、グリコシル化パターンの変動によるいくらかの異質性を示す。タンパク質はNaDodSO₄-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関して単分散であり、精製ヒト胎児トランスフェリンと同等のスペクトル及びスペクトル比を有する。

ヒト突然変異体トランスフェリンの製造

野生型（ホホ）の遺伝子の従来の単一文字アミノ酸記号、それに続いて一次配列中の置換の位置番号、（この場合成熟タンパク質のバリンを位置1と指定する）、及びそれに続く置換残基の記号を用いることにより

50bp間隔でコード配列の長さによって断片的に決定した配列決定プライマーを用いたジデオキシ配列分析により確認した。その後所望のコード配列を、制限消化により放出し、平端化し、前記の通りpNUT中に挿入した。

a) 金一長ヒト胎児トランスフェリン（hTF）及びb) アミノ酸残基単一分子（hTF/2N）の種々の特定部位の突然変異体のためのc) DNAを含むpNUTプラスミドが構築された。これらの突然変異体は、1) ヒト胎児トランスフェリンのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異に基づくG65R、2) 英国の患者からのhTFのC-末端半分に見られる天然に起こる突然変異体に基づくG65R、c) ニフトリの胎児からのオボトランスフェリン（oTF）中のC-末端半分の野生型突然変異に基づくK206Q、d) ヒトラクトフェリン（hLTF）中の野生型突然変異に基づくH207R、及びe) 鉄結合部位の金属選択性を変える試みとしてのD63Cを含む。これらの構築物はすべてペド-ハルスター腫瘍細胞の安定な形質転換物中で、10-100mgの組み替えタンパク質の量で発現された。さらにoTFのための全長cDNA及びhTF/2N-oTF/2CならびにoTF/2N-hTF/2CのためのキメラcDNAを含むpNUTプラスミドが構築された。

特定部位の突然変異体の特性には：D63S突然変異体は鉄と結合するが（文献中の推測に反して）野生型タンパク質よりずっと弱いかであることが含まれる。例えばこの突然変異体は、85kDを含有するAGDゲルにおける電気泳動にてその結合能を失うが、野生型はその結合能を保持している。可視スペクトルの最大は422nmにあり、野生型の470nmと対照的である。G65R突然変異体は、野生型より鉄との

置換突然変異体を指定する。例えば位置83のアスパラギン酸残基がセリン残基により置換された変異体は、D63Sと指定される。

hTF/2N変異体の製造は、2通りの方法で行った。D818置換体は、Nelson, R. M. and Long, G. L. (1989) Analyt. Biochem. **180**: 147-151の方法を用いて製造した。簡単に述べると、hTF/2Nコード配列の5'末端からのHpaI/BamHIフラグメントをpUC18中にサブクローニングし、その後PCRに基づく2段階突然変異誘発法の解型として使用した。得られたDNAフラグメントをその後M13mp18中に再クローニングし、突然変異体構築物の配列をジデオキシ配列分析により確認した。その後フラグメントを、XbaI及びBamHIで消化することにより2本鎖形態の配列決定ベクターから放出し、最初のhTF/2N構築物からのSamHI/HindIIIフラグメントに連結して全長D81S-hTF/2Nコード配列を製造し、このサブライシングの忠実度を制限消化分析により確認し、その後前と同様にpNUT中にクローニングした。

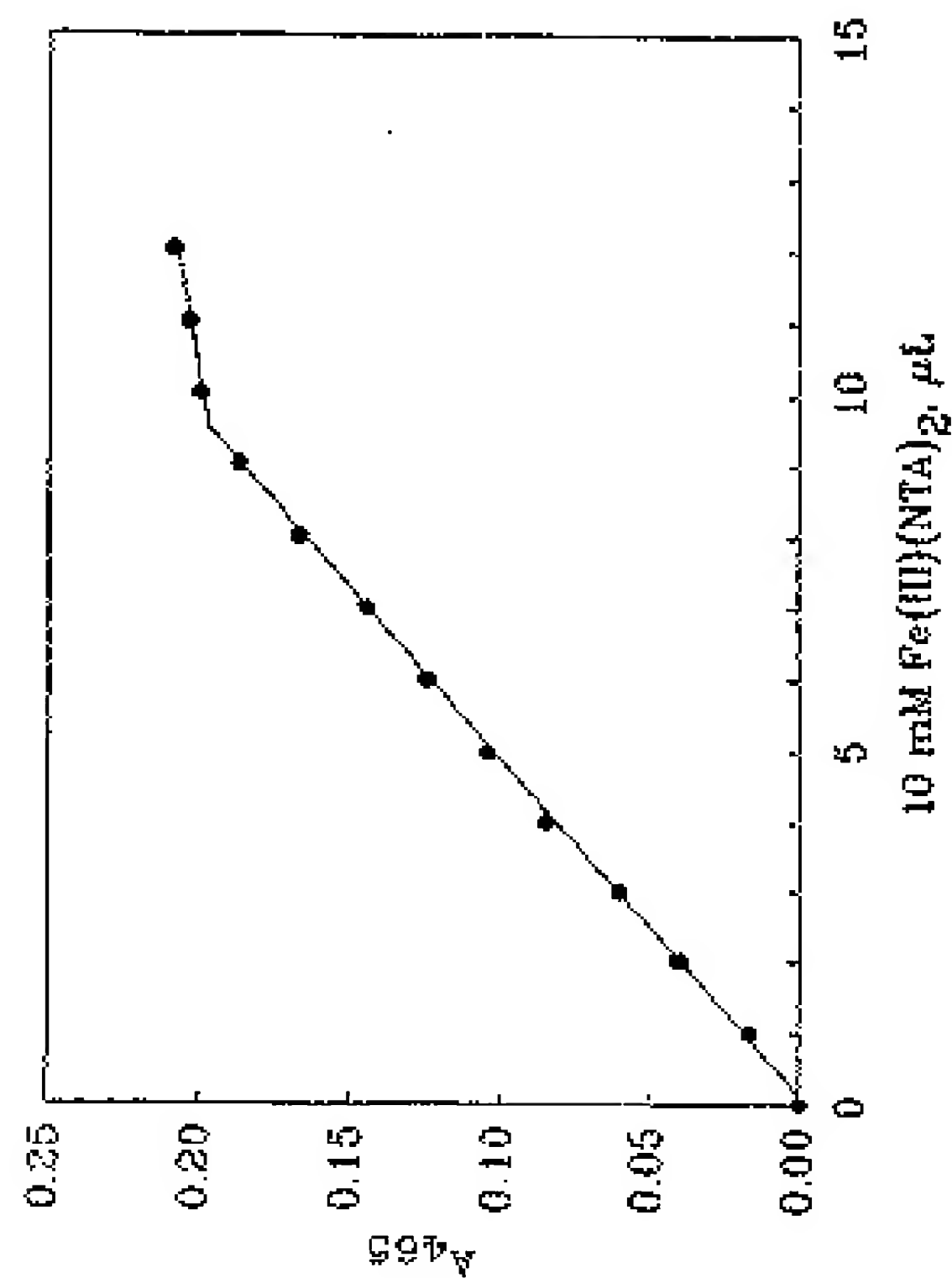
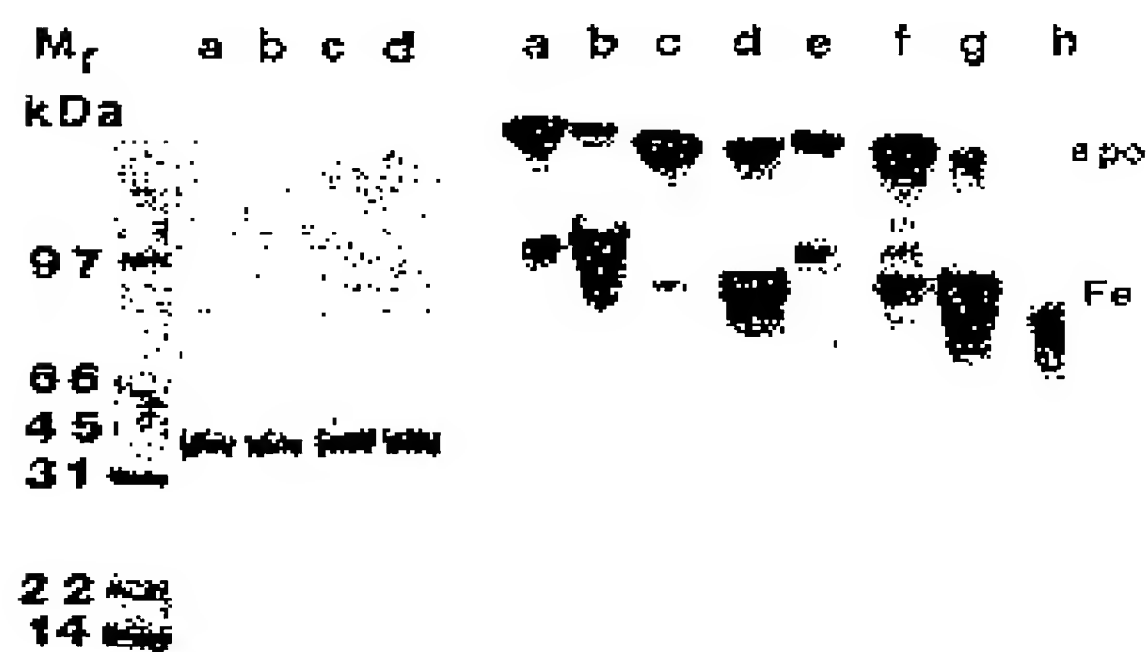
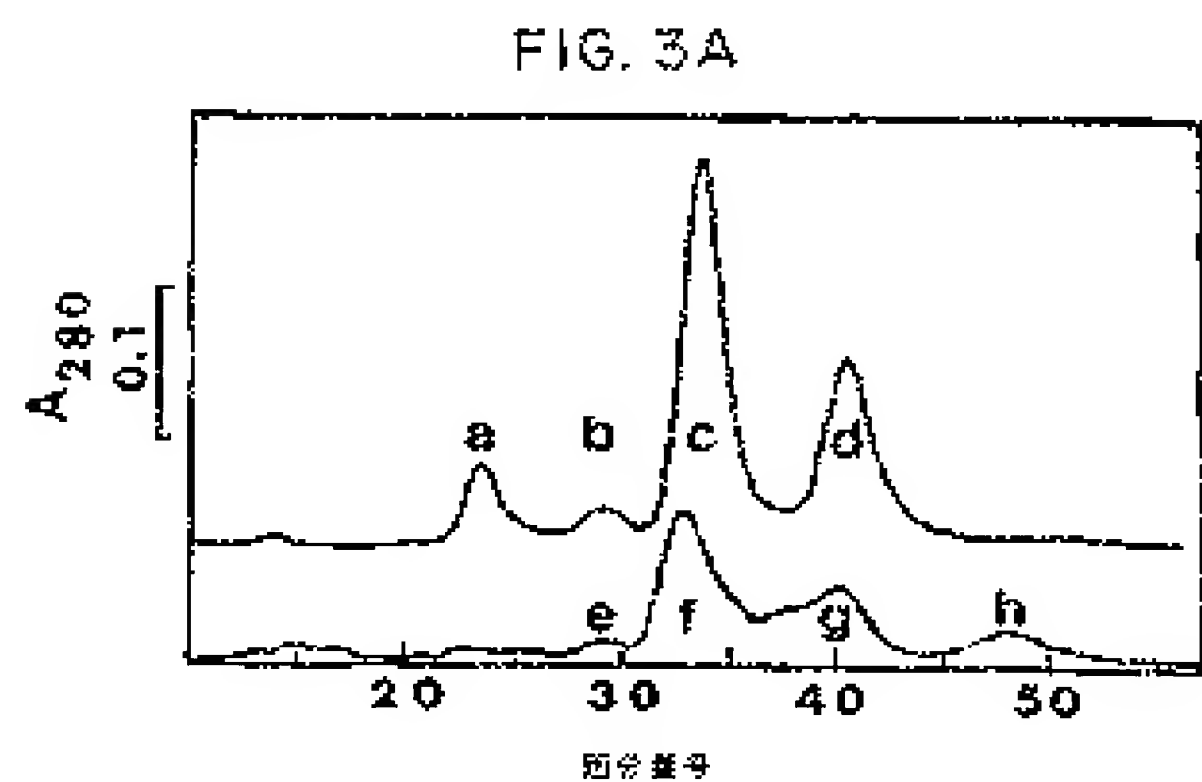
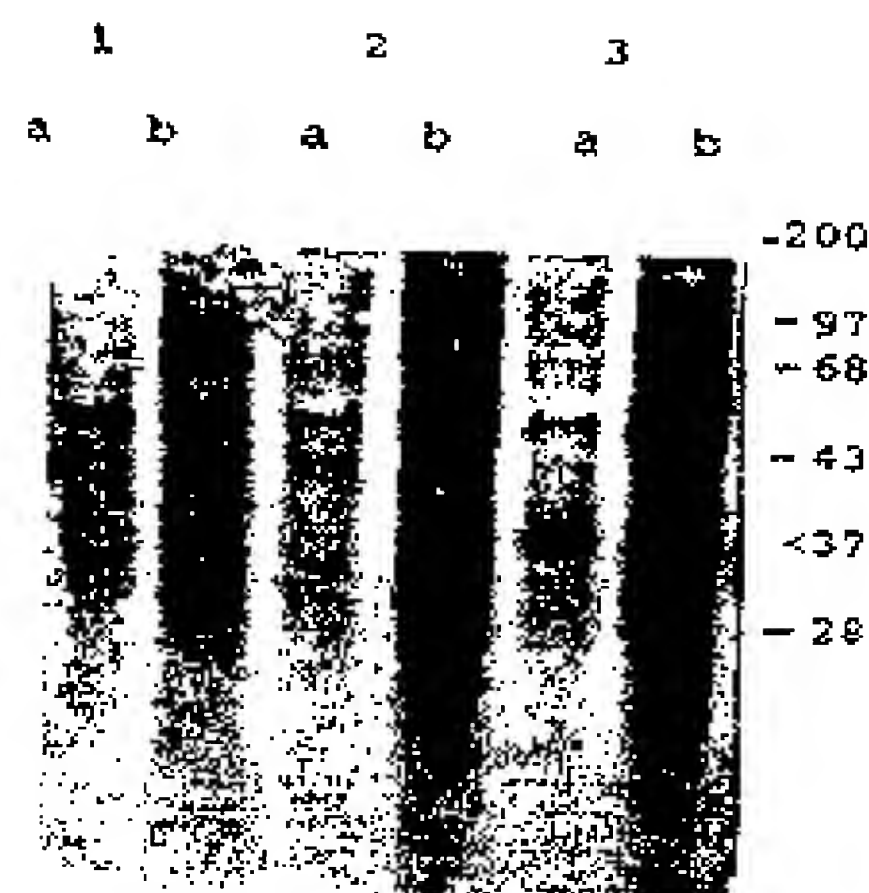
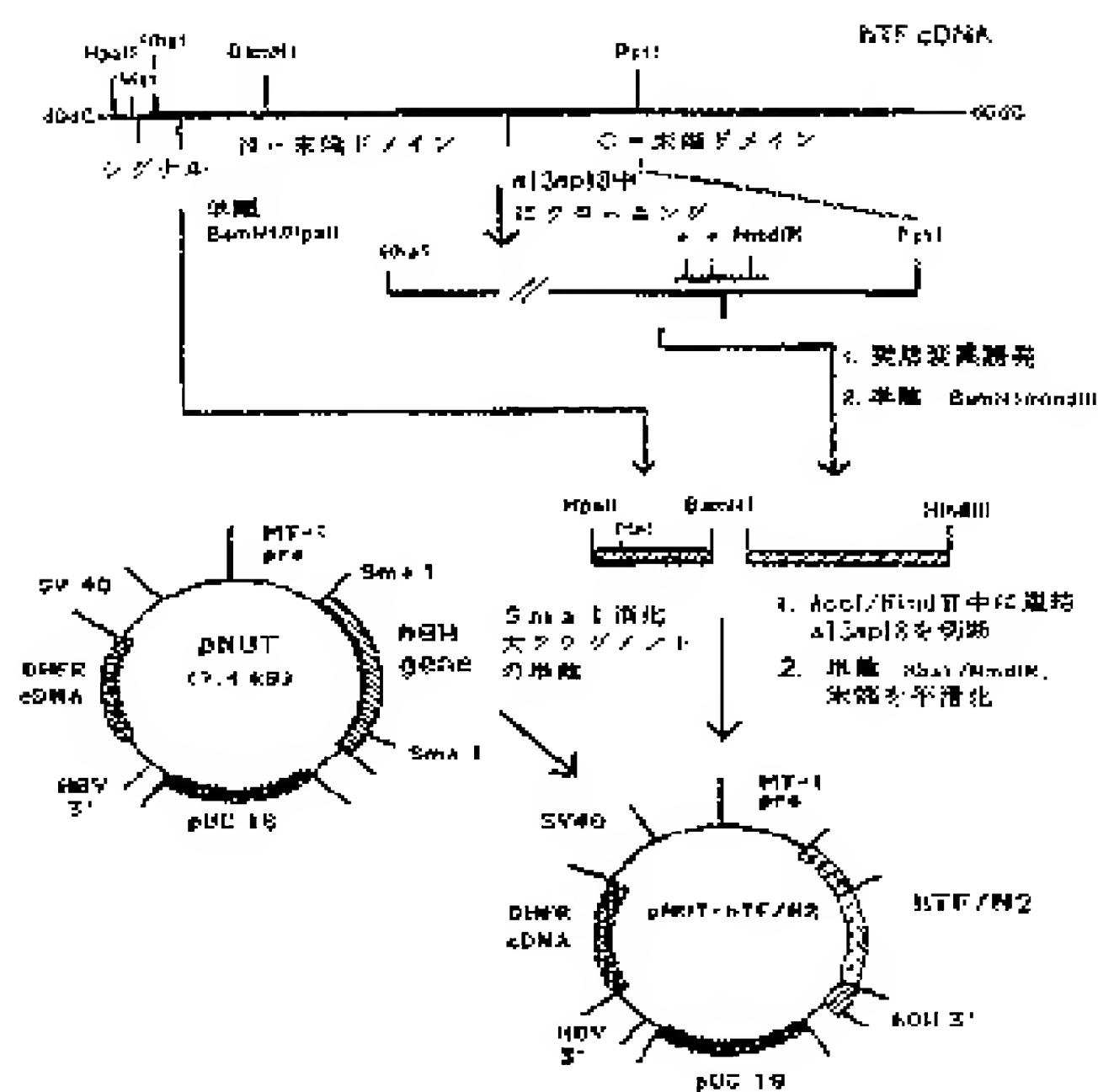
全hTF/2Nコード配列をM13mp18にサブクローニングし、その後それをオリゴヌクレオチド-指示突然変異誘発（Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. **100**: 458-600）の解型として用い、dui⁺、ung⁺選択株（Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 488-492）を用いることにより、置換突然変異体G65R、D63C、K206Q及びH207Rを製造した。突然変異誘発の後、突然変異体配列のための全コード配列を、2

結合が弱く、470nmに可視スペクトルの最大を有する。K206Q突然変異体は、そのモデルであるoTF/2Cと同様に野生型よりずっと弱く鉄と結合する。野生型タンパク質の色は、それぞれ1mMのEDTA及びNTAを含む0.5M酢酸緩衝液、pH4.9中で非常に速く消えるが、突然変異体は全く色を失わず、その結合能を放出するためにはpH4及び1mMのジフェロキサミンが必要である。アポ-突然変異体は、鉄との両結合力が野生型タンパク質より弱いようである。この突然変異体の場合の可視スペクトルの最大は460nmにある。

全長組み替えhTFは、S₀S₀-PAGE上で血清-誘導タンパク質と同速度で移動する。

同等性

当該技術における熟練者は、本文に記載の特定の方法に関する多数の同等物を日常的実験のみを用いて認識する、又は確めることができるであろう。そのような同等物は本発明の範囲内であり、以下の請求の範囲に含まれると考えられる。



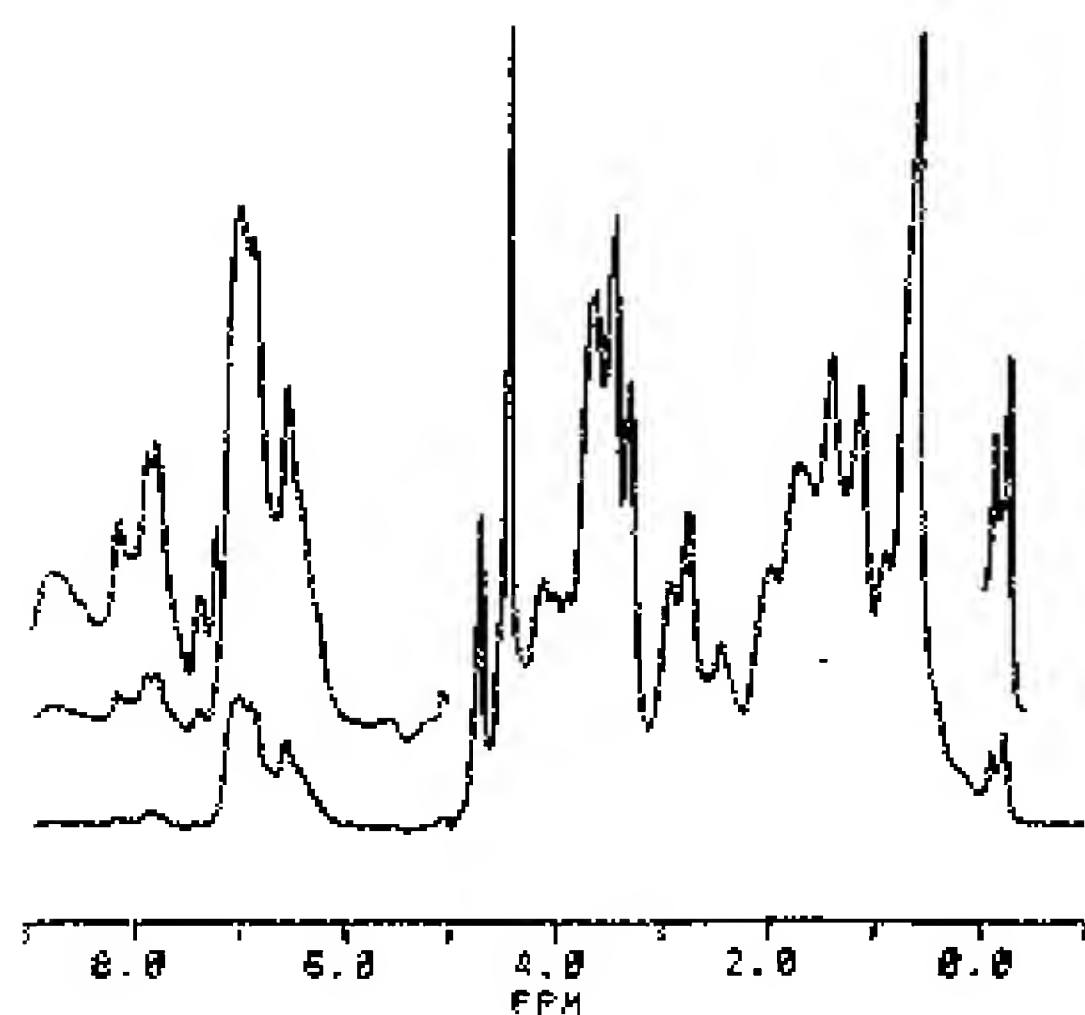


FIG. 5A

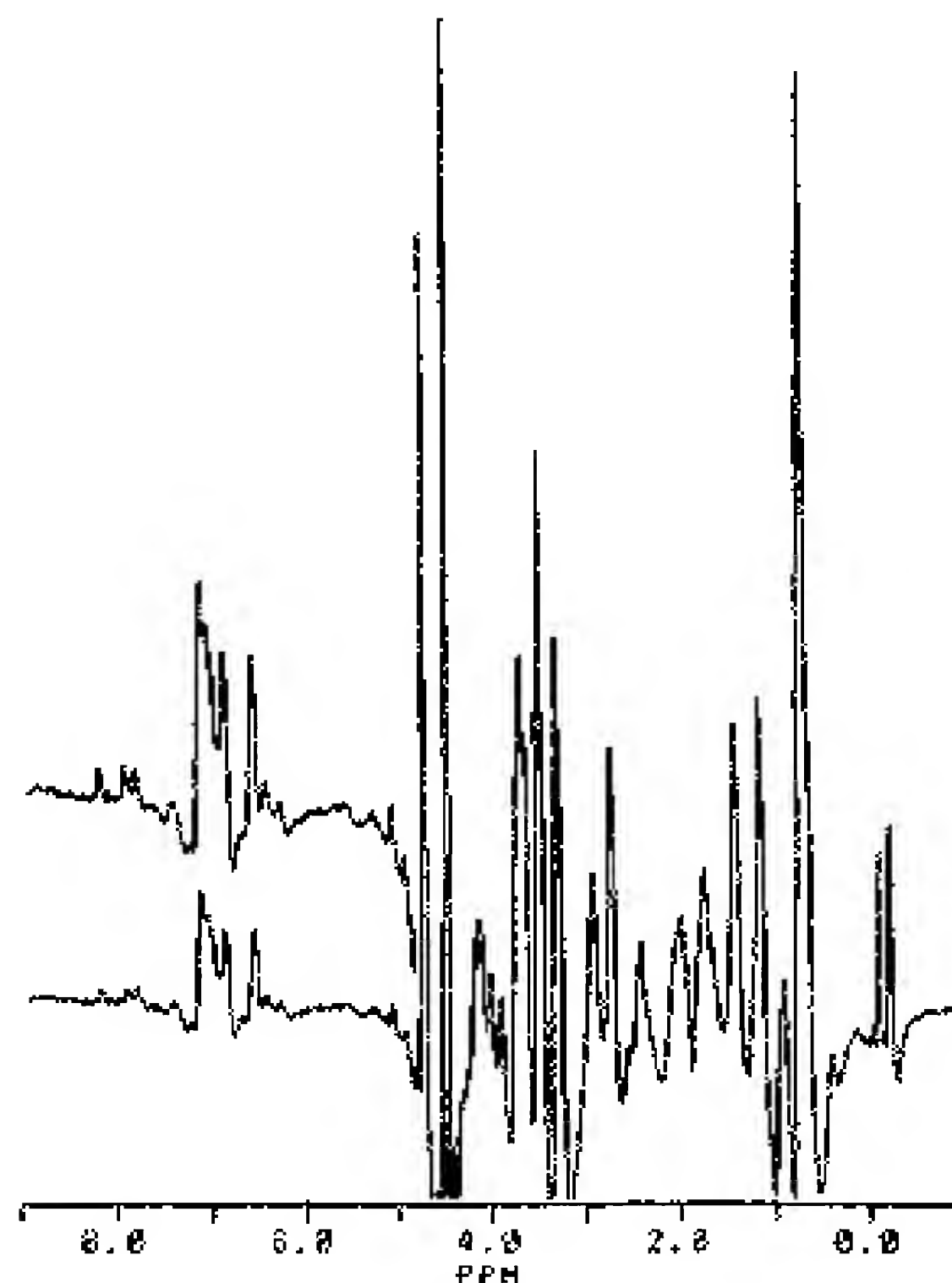


FIG. 5B

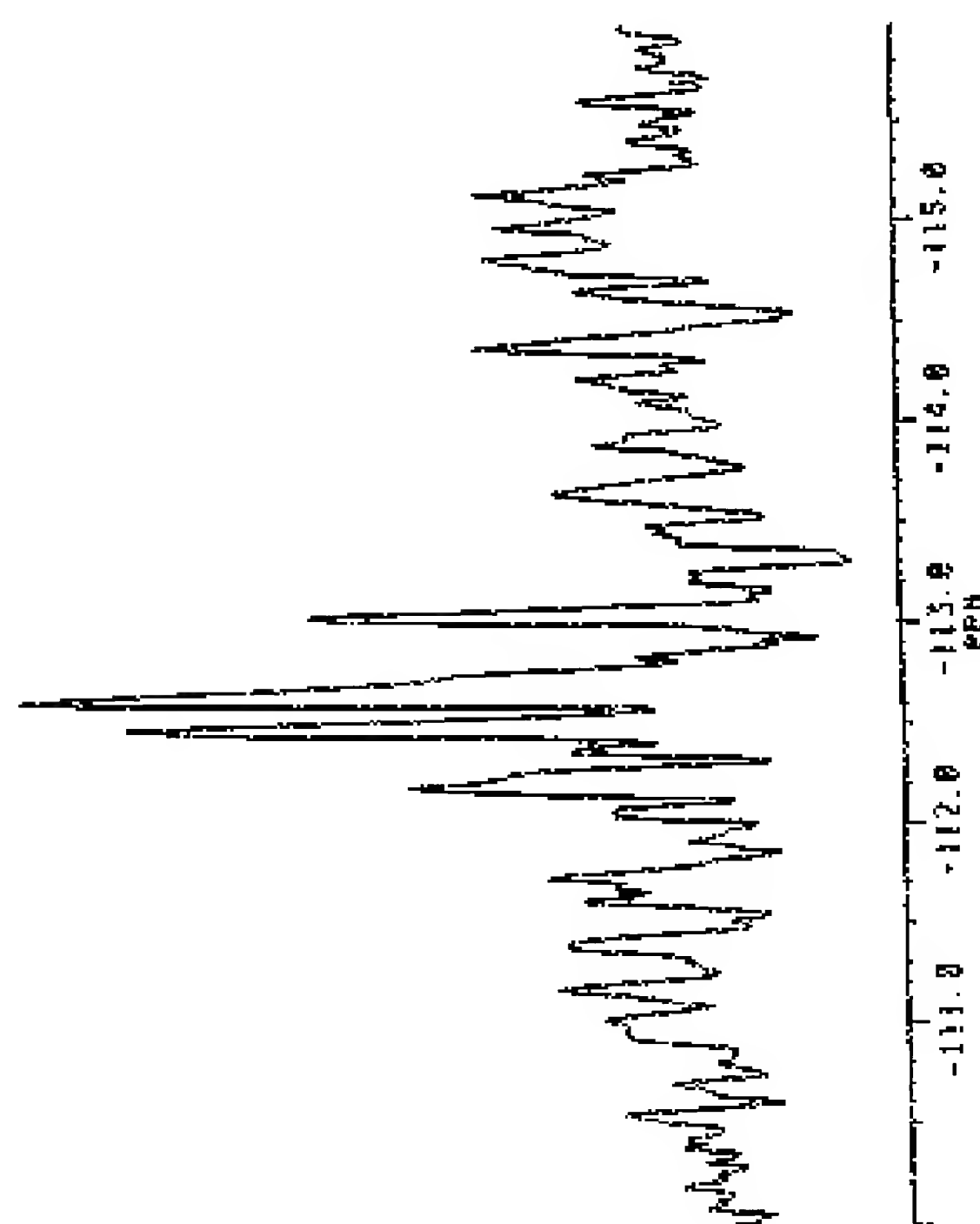


FIG. 6

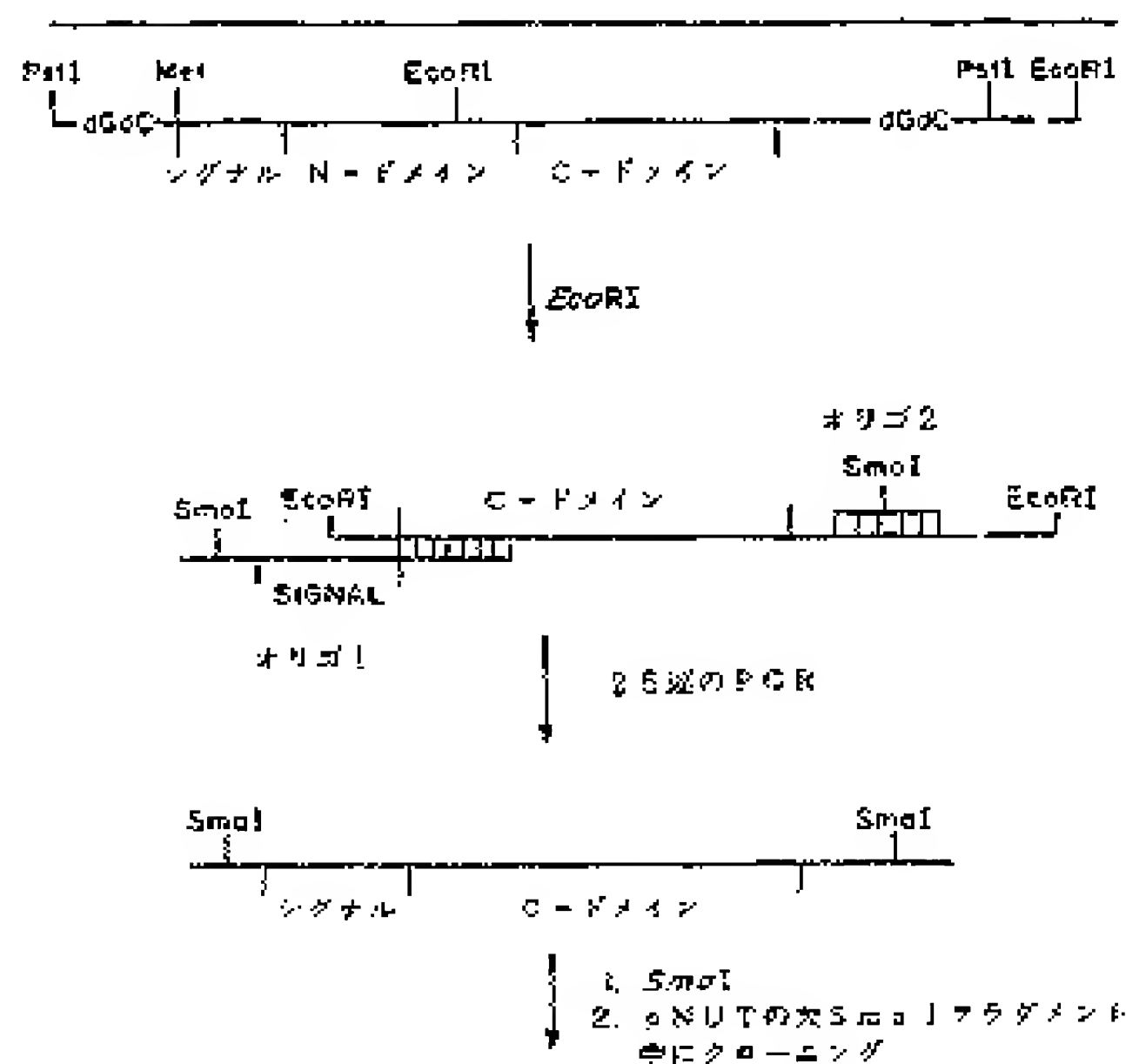


FIG. 7

補正書の写し(翻訳文) 発 出 書 (特許法第184条の8)

請 求 の 範 囲

平成5年8月6日 出願

特許庁長官 麻 会 稔 殿

1. 特許出願の名称

PC7/US92/00928

2. 発 明 の 名 称

縮み歪みトランスフェリン、トランスフェリン半-分子、
及びそれらの突然変異体

3. 特 許 出 願 人

送 所 アメリカ合衆国バーモント州05405バーサントン
(番地なし)名 称 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・ステイト・
アドリカルチュラル・カレッジ (ほか1名)

4. 代 理 人 〒107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自転車会館

氏 名 (6078)井坂正 小 岡 昌 平 吉

電 話 3583-2256



5. 補正書の提出年月日

1993年5月4日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1 通



治療的組成物。

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリンの基本的に特異な組成物。

10. 他のヒト血清タンパク質を含まない鉄-結合ヒト血清トランスフェリンの基本的に特異な組成物。

11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を、トランスフェリンを発現させる条件下で培養し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機能的活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

12. ベクターがプラスミドpRII7である、請求の範囲11に記載の方法。

13. 真核細胞がベビーハムスター腎臓細胞である、請求の範囲11に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの誘導可能プロモーターに作動的に結合した、トランスフェリン又はその一部をコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を培養し、

b) プロモーターを誘導してトランスフェリンの発現を誘導し、

c) 発現されたトランスフェリンを回収する段階を含む、機能的活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

15. プロモーターが強発現可能メタロチオネインプロモーターである、請求の範囲14に記載の方法。

16. a) 請求の範囲2に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞をトランスフェリンを発現させる条件下で培養

し、哺乳類トランスフェリンのアミノ末端を含む突出部とは別に基本的に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含む突出部を含む、機能的活性トランスフェリン半-分子。

2. 少なくともトランスフェリンの1番の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まず、突然変異体が金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合力より強い結合力を有する、機能的活性突然変異体哺乳類トランスフェリン半-分子。

3. 鉄に対して天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、請求の範囲2に記載の突然変異体トランスフェリン半-分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1番の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲3に記載の突然変異体トランスフェリン半-分子。

5. 少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含むトランスフェリンの1番の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まない哺乳類トランスフェリンの機能的活性半-分子を金属の循環量を基準量以下に下げるのに十分な量で含む、金属キレート化治療で用いるための治療的組成物。

6. 金属が鉄である、請求の範囲5に記載の治療的組成物。

7. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンより激しく金属に結合する突然変異体である、請求の範囲5に記載の治療的組成物。

8. トランスフェリン半-分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲7に記載の

し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリン。

国際調査報告

International Application No. PCT/JP88/00139

1. SUBSTANTIVE INFORMATION Abstract of the International Application The present invention relates to a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
2. PRIOR ART The prior art includes the use of vectors which contain a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The prior art also includes the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The prior art is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
3. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS The drawings show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	
5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
6. CLAIMS 1. A method of producing a recombinant protein in a host cell, comprising the steps of: (a) providing a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell; (b) introducing the vector into the host cell; (c) expressing the recombinant protein in the host cell; and (d) purifying the recombinant protein.	
7. REFERENCES The following references are cited in the present invention:	
8. OTHER INFORMATION The present invention is described in the accompanying drawings, which show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	

Form PCT/JP88/00139 (International Application No. PCT/JP88/00139)

International Application No. PCT/JP88/00139

FURTHER INFORMATION CONTAINED IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

1. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
2. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS The drawings show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	
3. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
4. CLAIMS 1. A method of producing a recombinant protein in a host cell, comprising the steps of: (a) providing a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell; (b) introducing the vector into the host cell; (c) expressing the recombinant protein in the host cell; and (d) purifying the recombinant protein.	
5. REFERENCES The following references are cited in the present invention:	
6. OTHER INFORMATION The present invention is described in the accompanying drawings, which show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	

Form PCT/JP88/00139 (International Application No. PCT/JP88/00139)

International Application No. PCT/JP88/00139

1. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
2. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS The drawings show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	
3. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION The present invention provides a method of producing a recombinant protein in a host cell, and to a method of purifying the recombinant protein. The method involves the use of a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell. The method also involves the use of a host cell which is capable of expressing the recombinant protein. The method is particularly useful for the production of recombinant proteins in a host cell which is capable of secreting the recombinant protein.	
4. CLAIMS 1. A method of producing a recombinant protein in a host cell, comprising the steps of: (a) providing a vector which contains a gene for the protein to be produced, and a promoter which is inducible in the host cell; (b) introducing the vector into the host cell; (c) expressing the recombinant protein in the host cell; and (d) purifying the recombinant protein.	
5. REFERENCES The following references are cited in the present invention:	
6. OTHER INFORMATION The present invention is described in the accompanying drawings, which show the construction of the recombinant protein, and the method of producing the recombinant protein. The drawings also show the method of purifying the recombinant protein.	

Form PCT/JP88/00139 (International Application No. PCT/JP88/00139)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 P 21/02	Z N A	C 9282-4 B	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
		8412 -4 B	
			C 1 2 N 5/00 B
			//(C 1 2 N 15/09 Z N A A
			C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 フランク、 ウォルター・デイ
 アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・
 アpartment 2262・オードリアロード
 11991

(72)発明者 マツギリブレイ、 ロス・テイ・エイ
 カナダ国ブイ6テイ 1テイ7・ブリテイ
 ツシユコロンビア・バンクーバー・アリソ
 ンロード2233・アpartment 807

(72)発明者 メイソン、 アン・ビー
 アメリカ合衆国バーモント州05445シャー
 ロツテ・ノースグリーンブツシユロード
 (番地なし)

(72)発明者 ウツドワース、 ロバート・シー
 アメリカ合衆国バーモント州05482シエル
 バーン・ローガンレイン 4